

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 03047087
PUBLICATION DATE : 28-02-91

APPLICATION DATE : 23-03-90
APPLICATION NUMBER : 02074192

APPLICANT : AJINOMOTO CO INC;

INVENTOR : KIKUCHI REIKO;

INT.CL. : C12P 21/00 A23C 9/13 A23L 1/39 A23L 2/00 C08G 69/10 C12G 3/02 // A61K 31/785 A61K 35/74 (C12P 21/00 , C12R 1:125)

TITLE : NEW GAMMA-POLYGLUTAMIC ACID, PRODUCTION THEREOF AND DRINK AGENT CONTAINING THE SAME

ABSTRACT : PURPOSE: To enable production of γ -polyglutamic acid containing $\geq 90\%$ L-isomer and development of a drink agent consisting essentially thereof by culturing *Bacillus NATTO* belonging to *Bacillus subtilis* in a culture medium composed of specific ingredients.

CONSTITUTION: *Bacillus NATTO*, such as *Bacillus subtilis*, belonging to *Bacillus subtilis* is cultured in a culture medium, consisting essentially of four ingredients of an amino acid source, such as glutamic acid, a carbon source, such as glucose, an inorganic substance, such as phosphate, and biotin and containing $\leq 0.2\text{ppm}$ or no manganese ions at about $30\text{--}45^\circ\text{C}$ temperature. The resultant culture solution is then purified by an alcohol precipitation method, etc., to provide γ -polyglutamic acid, having $\geq 90\%$ L-glutamic acid content and $5000\text{--}1000000$ average molecular weight and soluble in water. The obtained γ -polyglutamic acid as a drink agent is added to fruit juice beverages, sports drinks, etc. As a result, viscosity is imparted to the beverages to improve taste and drinkability thereof.

COPYRIGHT: (C)1991,JPO&Japio

卷之三

◎特許出版公會

◎ 公開特許公報 (A) 平3-47087

◎印. Cl. * 識別記号 序内整理番号 ◎公開 平成3年(1991)2月26日
C 12 P 21/00 A 8214-4
A 23 C 3/13 8114-4
A 23 L 1/33 8114-4
C 06 G 69/10 N R N 6977-4
C 12 G 3/02 9053-4
※ 8114-4
※

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全6頁)

◎発明の名称 新規ガンマ-ポリグルタミン酸、その製造方法及びこれを含有する飲料用剤

②特 領 平2-74192

◎出 類 平2(1990)3月23日

優先權主張 ②平1(1989)3月22日③日本(JP)④特願 平1-71125

株式会社中央味の素
〒111-0052 神奈川県川崎市川崎区鈴木町
電話番号: 044-571-1111

◎発表者 翁玲子 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-11 索の素株式会社中央研究所内

の出 瞳 人 株 の 素 株 式 会 社 東 京 都 中 央 区 京 橋 1 丁 目 5 番 8 号
最終頁に綴ぐ

33 33 33

卷之三

新成分マー・ポリグルタミン酸、その
製造方法及びこれを含むする飲料用新
た、特許請求の範囲

(ii) 该成アミノ酸がグルタミン酸であり、全グルタミン酸中のL-グルタミン酸含有率が98%以上であり、平均分子量が5千~100万である新規ガラクトー酸性グルタミン酸。

(3) アミノ酸を基質とし、少なくとも炭素源、無機質、及びビオチンを必須成分とし、マンガンイオンを含まないか又は0.2 ppm以下を含む培地でバチルス・ズアチルスに対する細菌より発生されることを特徴とする、請求項(1)記載の新規ガンマー、ポリグルタミン酸の製造方法。

(3) 既次項(1)記載の新規ガムマー・ポリグルタミン酸またはその塩を含有すること特徴とする飲料用剤。

卷之三

（樂隊上的列隊分列）

本院環境、食品業、製藥業及醫務、

（從來の技術及び問題点）

従来より、熱変性がガムマー、ポリグルタミン酸を生成することは知られていた。また、そのポリグルタミン酸の自体とし体の比率が培地に加入するマンガンイオンの濃度、アミノ酸の種類または培養時間などで、著しく変動するという報告もいくつがある。(K.K.Ward, R.F.Anderson, F.K.Bean, *Biotechnology and Bioengineering* Vol. V, 41~48 (1963)、短井久雄: *農化* 第37卷、第10号、515~518(1963)) マンガン濃度を 10^{-7} ~ 10^{-5} mol/l に変化させた所、マンガン濃度を低くするにつれし体の含量が増加する傾向があった。この方法では、生体系に多いし体の比率は最大80%までもしか達していない、し体の比率がこれ以上高含率のものは知られておなかつた。

（六）總務處總務科（科長：王士林）：辦公室、總務科、財務科、人事科、外事科、接待科、

し体を85%以上含むするガンマ- , ポリグルタミン酸の開発が既に成功, その研究もさること

② 朝鮮民族主義者たちの反日運動

¹¹ See also the discussion of the 'moral economy' in the following section.

上記の問題を解決すべく試験研究した結果、パデルス・ズブチリスに属する新豆蔻(微工研究號 FERN P-10867)が発生するし体を 90 % 以上含むするガムマー、ポリグルタミン酸及びその製造方法ならびに歯頬ガムマー、ポリグルタミン酸を主成分とする飲料用調剤を開発することにより本発明を完成させた。本発明を実現する。

たなわち本発明は、構成アミノ酸がグルタミン酸であり、全グルタミン酸中のレーグルタミン酸を資源が80%以上であり、平均分子量が5千~100万である新規ガムマー・ポリグルタミン酸、その製造方法、及びこれを含むする歯科用剤である。

本装置の新規ガンマー・ボリグルタミン酸は、
構成アミノ酸がグルタミン酸であり、全グルタミ
ン酸中のD-α-体含有率が89%以上であり、比旋光度
(α)_{25°C}^{25°C} = +133° ~ +241° であり、酸性下 (α D
2.0) でも成膜せず、平均分子量が5千 ~ 100万であ
り、エンドドリン反応、ビウレット反応、アンス

ゲリセリン、マルトース、シュークロース、フラクトース、ビルピン酸ナトリウム、これらの混合物または複合物、微生物、動物等より得られる炭素源を含む抽出物等を炭素源とし、リン酸塩、マグネシウム塩、鉄塩、カリウム塩または塩化ナトリウム等を無機質とし及び、ビオチンの四成分を必須成分とする。マンガンイオンは、通常の培地中に添加する量では、本発明の新規ガンマー・ホリゲルタミン酸の発生には不適当であり、本発明では全く含まないか又は0.2 ppm以下に制限することを特徴とする。

培養温度は30~45℃、培養回数は2~15回、
液流・静置のどちらでも可能であるが、効率の点
から、34~40℃、3~7回、振盪の条件が適ま
る。

精製方法は主に二方法、すなむち硫酸銅による沈殿法 (Throne, S.C., C.G. Gause, H.E. Nunes and R.O. Hedgesright, *J. Bacteriol.*, 88, 307 (1954))、及びアルコール沈殿法 (上記、 H.M. Ward, S.F. Andersen and F.G. Dean : *Biochemistry and Bioc*

ロン反応、モリッシュ反応及びエルジン-モルガン反応は陰性を示し、水に可溶であり、硫酸アシモニウム、トリクロロ酢酸により沈殿せず、メタノール、エタノール、硫酸銅、硫酸バリウム、アセトン及びリバノールにより沈殿し、その水溶液を熱処理(120°C, 20分)しても沈殿を生じず、酸性下で 1530 cm^{-1} 、 1550 cm^{-1} 、 1630 cm^{-1} 、 1650 cm^{-1} にそれぞれ特徴的外端吸収スペクトルを示す性質を有する。

本発明における納豆菌とは、バチルス・ズブチルス、バチルス・バチルス・リッヂエニフォルミス、バチルス・メガテリウム、バチルス・メッセンテリカス、及びバチルス・アントラシル酸ポリグルタミン酸を主成分とする粘質物を産生するバチルス属細菌を指す。

本発明の新規ガムマー・ホリグルタミン酸の誕生に用いる培地は、グルタミン酸、プロリンまたはアラニン等の既知のアミノ酸、そのほか、これらの中合物または大麦、小麦等より得られるアミノ酸を含む液状物質であるガム酸化物、グルコース、

ngeneering, 5, 81 (1963). 沢浦憲、村川武雄、村尾祝夫、大野源次郎: 糖化, 第47号, 第3号, 153 ~ 165. (1973) 等が紹介しており、どちらでも純度 95 % 以上の標品が得られたが、飲料溶剤として用いる場合は後者の方が適当らしい。具体的に示すならば、糖液度に飽和食塩水を 10 % (v/v) 添加し、99 % エタノールはガラス棒で搅拌しながら添加し、枕露を巻き取り、これを 3 % 食塩水に溶解させ、遠心により不溶物を除去し、上澄みを一昼夜透析する。これで得られた透析内液が即ポリグルタミン酸の水溶液であり、以後、エタノール沈殿と透析を繰り返すこにより純化を進め、最後に液状乾燥により精製ポリグルタミン酸を得る。

本発明でいう飲料用剤とは、果汁飲料、スポーツドリンク、乳酸菌（食べるヨーグルト）等の濃淡飲料水、アルコール飲料またはソーラー等に添加するものである。飲料用剤の形状はオリゲルタミン酸またはその塩、及びこれらと接觸して出来する炭酸物との複合物を液状乾燥などの形態によって得

される粉末、または粉末を混式または乾式造粒した顆粒状、粉末または顆粒状粉末をそのまま、または成形用その他の如て一定の形状に圧縮した錠剤、または、該粉末を水等の溶媒に溶解させて得た溶液、またはゲル等である。ポリグルタミン酸を飲料用剤として飲料に添加（ 1×10^{-1} %～ 5 %）すると粉末の飲料にはない、粘性、口当たりの良さが得られる。またポリグルタミン酸は水溶性であるため、食物流線とは言っても、摂取後喉頭領域のザラザラした舌に残るような不快感もなく、また沈降による不均一性もない。

また溶解するほどにより、飲料の酸味が抑えられ、味がまるやかになるという効果もわかった。

本発明において、飲料用剤としてポリグルタミン酸を用いるに際して飲料用剤調製時に用いられる他の高分子物質と併用することに制限はない。

また他の低分子化合物あるいは無機化合物、香料、防腐剤または保存剤等と組み合わせて用いること及び各種物質と組み合わせることについても何ら制限はない。

$\text{NaSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ は、0.0.1. 0.8 mg/lの三段階にした。天然界よりリスクターニングしてきたバチルス・ヌアテリス（バージェスマニュアル第3版により同定）竣工試験紙（竣工試験紙 FERM P-10607）を培地A上で1日、30℃にて前培養した。これを生理食塩水にて $0.8 = 0.7$ (578 μg) になるよう溶解させ、培地Bに0.5 ml/dlずつ接種した。培養は40℃、7日間、120回/分の振盪にて行った。培養液は、10%の食塩水、及び二倍量のエタノールを加え、沈澱物を取り、50%のエタノールで脱水し、小さな断片にし、真空中にてエタノール除去をした。これを3%食塩水に懸濁後、23,000 rpmにて遠心し、その上澄みを一級透析液とした。透析しなサンブルは、倒槽にしてエタノールにより回収した。この過程を3回繰り返し、最後に透析内液を凍結乾燥させることにより、純度95%以上の純白蛋白をえた。本標品を6規定の培養中で100℃、6時間加水分解し、30℃でエバボレーションヘッドを用いて溶液を除去し、水に再溶解させてからDシアノ酸分離用カラム（MCI GEL C8S10Y）を用い

本発明の飲料用剤にフラクションを含む多様が含まれていても良い。

ガンマー・ポリグルタミン酸を飲料用剤に加工した後、飲料に添加するについては、そのまま加えてもまた溶解を容易にさせるために水等の溶媒に溶解させてから添加しても良い。

以下、本発明を実施例により更に詳細に説明する。

実施例1～3

培地A…青竹原天培地

培地B

グルコース	5 %
レーダルタミン酸ナトリウム	1.5 %
KNa_2PO_4	0.27 %
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0.43 %
ベニチ	0.05 %
$\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05 %
ピオテン	100 %

83.7.8

た液体クロマトグラフィーにて、D-及びL-グルタミン酸の定量を行った。結果を表1に示す。 $\text{NaSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ が0.1 mg/lの範囲でし水の比率が、95%以上、0.8 mg/lで約50%というし水の比率の高いガンマー・ポリグルタミン酸ナトリウムを得た。

比較例1及び2

実施例1において $\text{NaSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ を8及び20 mg/l用いた以外は同様にした。結果を表1に示した。

表1

		$\text{NaSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 濃度 (mg/l)	Na^+ (cpm)	ポリグルタミン酸中のし水 の比率 (%)
実 施 例	1	0	0	95.1
	2	0.1	0.035	96.2
	3	0.8	0.2	91.3
比 較 例	1	8	1.6	82.9
	2	20	5	72.5

卷之四

実験例1) で得たし体含率が 3.5.1 % のポリグルタミン酸ナトリウム原発物 1.0 g と等量のメチルセルロースを混合機で均一に混合し、混和液にかけ、5.0 g エチアルコール(メチルセルローズの 2.0 倍)を加え、さらに混合した。これをエタリッパー等出し式造粒機で乾燥、乾燥及びふるいの工程を経てポリグルタミン酸ナトリウムの粗度 1.8.3 % を得た。

卷之三

実験例 3 で得たし林含有率 9.1.3 % のポリカルボキシ酸ナトリウム 5 % 水アスパルテーム原末を加え以下実験例 4 と同様にして、アスパルテーム含有のポリカルボキシ酸ナトリウム濃度 3.6 % を得た。

第 10 页

実験例もて得られたポリグルタミン酸ナトリウム溶液を基び、賦形剤としてメチセルロースを適量加え、半胱因式打鍛機で、ポリグルタミン酸ナトリウムの緩衝液を供給した。

实验设计

実験例2と同様にして得たし体含有率 6.3 % のポリグルタミン酸ナトリウム 1.0 g の割合で水に溶解させた。得られた半融状物はレトルトパックに入れ加圧滅菌殺菌をして保存した。殺菌及び保存中(常温もヶ月)のポリグルタミン酸の変性は見られなかった。

寒流卷八

実施例4で得たポリグルタミン誘導化合物用いて下記成分を用いた果汁飲料（ショット）を試作し該飲料の改善を試みた。混合比は表3の通りである。

33

成 分 名	混 合 比
レモンジュース	3.6 dl
シェリーワイン	7.2 dl
水	3.7 dl
ポリグルタミン酸鉄粒	3.0 g

洪武紀

実験例2と同様にして得たレバ含有量 9.0.8 % のポリグルタミン酸類約 2.8 % を市販のスポーツリンク（アルギン酸）に 0.3 % 添加した。コントロールとしてポリグルタミン酸無添加のスポーツドリンク（アルギン酸）を用いて、20人のパネラーに上り可能テストを行った。項目は粘性、口当たりのよさ、滋味であった。テストの結果は、表 4 に示す。

実施例8：♀の幼虫（ムシ上がった、♂：どちらともいえず高い、♀：下がった）

卷 6

給付			貢献度の算出			級差			減少率			
割合	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
実績例 3	18	2	9	12	5	3	1	4	15	13	5	2
△	19	1	6	13	4	3	1	3	16	—	1	1

多くのようやく、ボリュームラミン膜ナトリウム、
セの強度が、またはボリュームラミン膜ナトリウム
の膜を形成する強度を強度に強調するものとせんより強

特に結婚を付与し口当たりを良くし飲みやすさを改善し、他方、酸味を抑制することができた。

卷之四

実験例1で得たレバウゼーが 9.0 未満以上のポリ
グルタミン酸ナトリウム、及びポリグルタミン酸
をイオン交換樹脂 Dowex 50W で処理して得たポリ
グルタミン酸の物理的、及び化学的性質について
述べた。

66 无菌分装机

本研究では元素分析データによる海水組成推定法及びカルシウムの酸素同位体法を用いて検討した。結果は次のとおりである。

33

サンプル	元素	C	H	N
ポリグルタミン酸	48.05	5.36	1.084	
ポリグルタミン酸 ナトリウム	39.98	3.83	9.25	

卷之三

ポリグルタミン酸ナトリウム及びこれをも標定

被覆子もこのひの毎日朝水を要じて水を水を深め
て水を深めてもやらないくべ。水を深めてもや
るべ。水を深めてもやるべ。

5

呈色反応	カルボン酸ナトリウム	該加水分解物
ニンヒドリン反応	—	+
ピクレット反応	—	—
アンスコット反応	—	—
カリッキュ反応	—	—

卷之三

本物質は水に可溶であり、硫酸アンモニウム、トリクロム酸銀、及び熱處理(120℃ 35分)により沈殿を生じないが、メタノール、エタノール、硫酸銅、酢酸バリウム、アセトシ、及びリノール酸によって沈殿を生じる。

分 ポリグルタミン酸ナトリウムを0.05%の水溶液にして蛍光度をジャスコDIF-130 蛍光度計にて測定し、その消光係数より核酸光度($\text{mL}_{250\text{nm}}$)を求め、結果は表7の通り。

25

ポリグルタミン酸 中の L-体の比率(%)	比旋光度
86.3	+ 336°
93.1	+ 216°
91.3	+ 200°

ラーグルタミン酸及びレーグルタミン酸を 0.05
% の水溶液にして旋光度を測定した所、それぞれ
-23.1°、+24.1° となり、これらをきめし体の
純度と、実験例 1 のきめしアミノ酸分離用カラムに
より得めたきめし体の比旋光度よく一致した。

第三章 亂世的社會文化

ポリグルタミン酸ナトリウム、及びポリグルタミン酸を PBS: 細胞培養液により赤外線吸収スペクトルを測定した。測定にはバイオラド製赤外分光分析計 PBS-335/10 を用いた。中性及びアルカリ性下における結果、すなわちポリグルタミン酸ナトリ

少本社 14,130冊¹¹、及び 16,025 冊¹²、総出下冊を
行ふ状態。すなわちヨーロッパ・シテー社 14,300冊¹³、
15,600冊¹⁴、16,300冊¹⁵、及び 16,500冊¹⁶にそれぞれ特
殊版圖を有する。

342 883

ポリグルタミン熱中の全グルタミン酸に対する
し体含有率による微性下での溶解性について調べ
た。実施例1で得たガンマ-・ポリグルタミン酸
ナトリウムをイオン交換樹脂 Chelex 504で処理して
ガンマ-・ポリグルタミン酸にした後、微性下で
の溶解性を調べた。試験50 mgを蒸水2 mlに溶解後
10 %の HClにて pHを2に合わせ、さらに水を加えて
3 mlにした。3 ℃にて24時間放置後、15,000 gで
遠心し、沈殿物の量を測定した。結果は以下の通
じである。

比較例 3

比較例2で得たし様含有量72.3%のガムマー・ポリグルタミン酸ナトリウムを用い、実施例1に準じて成膜物の量を測定した。結果を併せて表6に示した。

表 6

	し様の含有量(%)	沈殿物の乾燥重量(mg)
実施例1	95.1%	0
比較例3	72.3%	10.8

(発明の効果)

前記により本発明の全グルタミン酸中のしゃグルタミン酸含有量が90%以上である新規ガムマー・グルタミン酸とその製造方法を開発した。本発明の新規ガムマー・ポリグルタミン酸は、溶性下でも溶解しないため、飲料条件にして充填袋を取り除く事が出来、また飲料条件でも透明の水溶液が得られた。本発明の新規ガムマー・ポリグルタミン酸を用いることにより、加える飲料に粘性を付与し、口当たり及び飲みやすさを改良し、滋味を抑える効果を有し、かつ、一般に受け入れやすいポリグルタミン酸を主成分とする飲料用剤を開発することができた。

特許出願人 味の素株式会社

第1頁の続き

◎Int.Cl.⁹ 識別記号 店内整理番号
 // A 81 K 31/765 ACR S 7421-4C
 35/74
 (C 12 P 21/00 8615-4C
 C 12 R 11/125)